·论著·

肠道菌群及其代谢产物苯乙酰谷氨酰胺在慢性心力衰竭患者中的变化研究

张振东[1]，蔡斌[2]，王宏伟[1，2]，乔增勇[1，2*]

【摘要】 **背景** 慢性心力衰竭（CHF）是各种心血管疾病的严重表现或末期阶段，肠道菌群及其代谢产物在心力衰竭的病理过程中起重要作用。越来越多证据表明，肠道菌群失调及其代谢产物紊乱可导致细菌移位、释放介质、炎性反应等，进而加重CHF病情。**目的** 分析肠道菌群及其代谢产物苯乙酰谷氨酰胺（PAGln）在CHF患者中的变化，探讨肠道微生物在心力衰竭中所发挥的作用。**方法** 选取上海交通大学附属第六人民医院南院心内科收治的心力衰竭患者58例为CHF组，另选取具有相同CHF危险因素但没有CHF临床症状表现及既往病史的患者46例为Control组，利用16S rRNA测序技术对两组患者的肠道菌群多样性和丰度进行分析。采用液相色谱串联质谱法（LC-MS/MS）检测两组标本血浆中的PAGln水平。**结果** CHF组左心室收缩末期内径（LVESD）、左心室舒张末期内径（LVEDD）、脑钠肽（BNP）、PAGln均高于Control组，左心室射血分数（LVEF）低于Control组（$P<0.05$）。BNP和PAGln水平诊断CHF患者的曲线下面积（AUC）分别为0.995、0.913。Venn图表明，CHF组特有OTUs数目少于Control组。α多样性分析表明，CHF组Chao 1指数低于Control组（$P<0.05$）；β多样性分析表明，两组的肠道菌群总体结构存在差异。属水平上，CHF组埃希氏-志贺菌属（Escherichia-Shigella）、巨单胞菌属（Megamonas）、克雷伯氏菌属（Klebsiella）、双歧杆菌属（Bifidobacterium）、副拟杆菌（Parabacteroides）、罗姆布茨菌（Romboutsia）相对丰度高于Control组（$P<0.05$），Solimonas和多尔氏菌属（Dorea）相对丰度低于Control组（$P<0.05$）。LEfSe分析结果显示毛螺菌科（Lachnospiraceae）、Solimonadaceae、Solimonas、Dorea、伯克氏菌科（Burkholderiaceae）在Control组中升高（$P<0.05$），肠杆菌科（Enterobacteriaceae）、埃希氏菌属（Escherichia）、Bifidobacterium、双歧杆菌科（Bifidobacteriaceae）、Klebsiella、乳杆菌科（Lactobacillaceae）、乳杆菌属（Lactobacillus）、巨单胞菌属（Megamonas）、理研菌科（Rikenellaceae）、另枝菌属（Alistipes）、Parabacteroides、盲肠坦纳菌科（Tannerellaceae）在CHF组升高（$P<0.05$）。典型相关分析（CCA）表明，BNP、PAGln、LVEDD、LVESD与CHF组菌群显著相关，其中BNP对群落变化影响最大。相关性分析表明，Escherichia-Shigella与BNP和PAGln呈正相关（$P<0.05$）；拟杆菌属（Bacteroides）与BNP呈负相关（$P<0.05$）；Romboutsia、梭杆菌属（Fusobacterium）、内考拉杆菌属（Phascolarctobacterium）与BNP和PAGln呈负相关（$P<0.05$）。**结论** CHF患者肠道菌群结构组成与具有相同合并疾病但没有CHF临床症状表现及既往病史的患者明显不同，多样性下降，肠道致病菌丰度明显升高，可能导致CHF患者体内PAGln水平上升，参与CHF的发生发展。

【关键词】 心力衰竭；苯乙酰谷氨酰胺；胃肠道微生物组；代谢产物；生物多样性

【中图分类号】 R 541.62 【文献标识码】 A DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0166

【引用本文】 张振东，蔡斌，王宏伟，等.肠道菌群及其代谢产物苯乙酰谷氨酰胺在慢性心力衰竭患者中的变化研究[J].中国全科医学，2023.[Epub ahead of print].DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0166.[www.chinagp.net]

ZHANG Z D，CAI B，WANG H W，et al.Study on the changes of intestinal flora and its Metabolite phenylacetylglutaminein patients with chronic heart failure[J].Chinese General Practice，2023.[Epub ahead of print].

Study on the Changes of Intestinal Flora and Its Metabolite Phenylacetylglutaminein Patients with Chronic Heart Failure

ZHANG Zhendong[1]，*CAI Bin*[2]，*WANG Hongwei*[1，2]，*QIAO Zengyong*[1，2*]

1.*Anhui University of Science and Technology*，*Huainan* 232000，*China*

2.*Department of Cardiology*，*The South Branch of the Sixth People's Hospital*，*Shanghai Jiaotong University*，*Shanghai* 201400，*China*

**Corresponding author*：*QIAO Zengyong*，*Chief physician/Professor*；*E-mail*：*qiaozy666@sina.com*

基金项目：上海市科学技术委员会面上项目（19JC1415704）；上海市奉贤区科学技术委员会面上项目（20201615）

1.232000 安徽省淮南市，安徽理工大学 2.201400 上海市，上海交通大学附属第六人民医院南院心内科

*通信作者：乔增勇，主任医师/教授；E-mail：qiaozy666@sina.com

本文数字出版日期：2023-05-26

【Abstract】 **Background** The intestinal flora and its metabolites play an important role in the pathology of chronic heart failure (CHF), which is a severe manifestation or terminal stage of various cardiovascular diseases. Increasing evidence has shown that dysbiosis of the intestinal flora and its metabolites can lead to bacterial translocation, release of mediators, inflammatory response and consequently aggravation of CHF. **Objective** To analyze the changes of intestinal flora and its metabolite phenylacetylglutamine (PAGln) in patients with CHF and explore the role played by gut microbiota in heart failure. **Methods** A total of58 patients with heart failure admitted to the Department of Cardiology of the South Branch of the Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University were selected as the CHF group, and 46 patients with the same CHF risk factors but without clinical symptoms and past medical history of CHF were selected as the control group. The abundance and diversity of intestinal flora in the two groups were analyzed using 16S rRNA sequencing. Liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was used to detect PAGln concentrations in the plasma of samples from both two groups. **Results** The left ventricular end-systolic diameter (LVESD), left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), brain natriuretic peptide (BNP), and PAGln in the CHF group were higher than the control group, and the left ventricular ejection fraction (LVEF) was lower than the control group ($P<0.05$). The area under curve (AUC) of BNP and PAGln levels for the diagnosisof CHF patients was 0.995 and 0.913, respectively. Venn diagram showed that the number of OTUs specific to the CHF group was less than the control group. Alpha diversity analysis showed that the Chao 1 index was lower in the CHF group than the control group ($P<0.05$). β diversity analysis showed that the overall structure of the intestinal flora differed between the two groups. At the genus level, the relative abundances of Escherichia-Shigella, Megamonas, Klebsiella, Bifidobacterium, Parabacteroides, and Romboutsia were higher in the CHF group than the control group ($P<0.05$), and the relative abundances of Solimonas and Dorea were lower than the control group ($P<0.05$). The results of LEfSe analysis showed that Lachnospiraceae, Solimonadaceae, Solimonas, Dorea, and Burkholderiaceae were elevated in the control group ($P<0.05$), and Enterobacteriaceae, Escherichia Bifidobacterium, Bifidobacteriaceae, Klebsiella, Lactobacillaceae, Lactobacillus, Megamonas, Rikenellaceae, Alistipes, Parabacteroides, and Tannerellaceae were elevated in the CHF group ($P<0.05$). Typical correlation analysis (CCA) showed that BNP, PAGln, LVEDD, and LVESD were significantly correlated with the CHF group, with BNP having the greatest effect on community changes. Correlation analysis showed that Escherichia-Shigella was positively correlated with BNP and PAGln; Bacteroides was negatively correlated with BNP; Romboutsia, Fusobacterium, and Phascolarctobacterium were negatively correlated with BNP and PAGln. **Conclusion** The structural composition of the intestinal flora in patients with CHF was significantly different from the patients with the same co-morbidities but without clinical manifestations and previous medical history of CHF, with a decrease in flora diversity and a significant increase in the abundance of pathogenic intestinal bacteria, which may lead to an increase in the level of PAGln in CHF patients and participate in the development of CHF.

【Key words】 Heart failure; Phenylacetylglutamine; Gastrointestinal microbiome; Metabolites; Biodiversity

慢性心力衰竭（chronic heart failure，CHF）是各种心血管疾病的严重表现或末期阶段。随着老龄化人口增加和疾病诊疗技术的发展，其发病率、患病率呈不断上升的趋势，引起全球范围的沉重疾病负担和巨大经济压力[1]。CHF 病理机制主要包括血液动力学紊乱、神经内分泌过度兴奋以及炎症反应和氧化应激激活等方面[2]。基于对发病机制的深入探索，目前临床上普遍应用 ACEI、ARB、ARNI、β 受体阻滞剂及醛固酮抑制剂等药物抑制心脏的病理性重构和抵抗肾素 - 血管紧张素 - 醛同酮系统的过度兴奋，从而降低病死率、改善患者生活质量，但 CHF 总体死亡率仍然很高，患者 5 年存活率与恶性肿瘤接近[3]。目前认为，CHF 引起的低心脏泵血量、肠道灌注不足可能会改变肠道生理结构，造成肠黏膜缺血和肠壁水肿，出现肠屏障功能受损和通透性增加，这些病理变化反过来又会导致细菌移位和血液内毒素水平增加[4-5]。肠道菌群是寄宿于人类胃肠道的复杂微生物群落，在组成肠道黏膜屏障、体内营养物质代谢、调节肠道炎症及肠道免疫功能等方面发挥重要作用。研究表明，肠道菌群紊乱与肠道炎症反应密切相关，免疫炎症机制能导致心脏不良重塑和心功能障碍[6]。此外有研究发现，由肠道微生物代谢生成的常见慢性肾脏病毒素苯乙酰谷氨酰胺（phenylacetylglutamine，PAGln）在主要心血管不良事件（major adverse cardiovascular events，MACE）患者和糖尿病患者中血浆浓度较高，且被认为是 MACE 风险的独立预测因子[7-8]，但少见关于 CHF 患者血浆 PAGln 水平变化的研究。因此，为进一步阐明肠道菌群及其代谢产物 PAGln 和 CHF 之间的机制，本研究选取同一时期 CHF 组和 Control 组患者为研究对象，比较两组肠道菌群变化和血浆 PAGln 水平的差异，探讨肠道菌群及其代谢产物对心力衰竭的影响，以期为 CHF 治疗途径开辟新思路。

1 对象与方法

1.1 研究对象 本研究选取 2021 年 6 月—2022 年 6 月在上海交通大学附属第六人民医院南院心内科住院的 CHF 患者 58 例作为 CHF 组，其中男 26 例，女 32 例；年龄 52~89 岁，平均年龄 77.5（73.0，84.0）岁；基础疾病冠心病 22 例，高血压 3 例，冠心病合并高血压 33 例。纳入标准：（1）CHF 诊断标准参照《中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018》[1]；（2）按照美国纽约心脏病协会（NYHA）分级心功能Ⅲ ~ Ⅳ级；（3）病例资料完整，通过数字病历系统收集患者的临床资料。选取具有相同合并疾病但没有 CHF 临床症状表现及既往病史的患者 46 例作为 Control 组，其中男 25 例，女 21 例；年龄 65~89 岁，平均年龄 78.0（74.8，81.3）岁；基础疾病冠心病 22 例，冠心病合并高血压 26 例。本研究经已通过上海交通大学附属第六人民医院南院伦理委员会审核批准（伦理批件编号：2021-KY-25-01），所有患者（或其直系亲属）签署知情同意书。

排除标准：（1）肥厚或限制型心肌病、心肌炎、急性心肌梗死、先天性心脏病；（2）糖尿病、腹泻、克罗恩病、溃疡性结肠炎、感染性疾病及恶性肿瘤；（3）严重肝肾功能不全；（4）入院前 3~6 个月服用过抗生素、类固醇激素、中草药（包括口服、肌肉注射或静脉注射）或益生菌（如酸奶）等；（5）入院前 1 周饮食大幅变化。

1.2 PAGln 检测方法 抽取两组患者入院 24 h 内静脉血 5 ml，于 EDTA 抗凝管中混匀，并分离 1 ml 血浆放入 -80 ℃超低温冰箱内保存。随后将收集的样本送至上海敏心生物科技有限公司，用液相色谱串联质谱法测定血浆 PAGln 水平。取血浆样品（100 μl）加入甲醇（400 μl）漩涡混合、超声振荡，然后离心（12 000 r/min，4 ℃，10 min），移取上清液并上机分析。使用 Acquity UPLC HSS T3（1.8 μm，2.1 mm × 100 mm）色谱柱进行色谱分离，色谱分离条件：流速 0.30 ml/min；柱温 40 ℃；进样量 5 μL；色谱流动相组成：A 水（0.1% 甲酸），B 甲醇；样本梯度洗脱程序：0~1.0 min 10% B；1.0~2.5 min 10%~90% B；2.5~3.5 min 90% B；3.5~4.0 min 90%~10% B；4.0~5.0 min 10%B。使用设置模式为热电喷雾离子源模式的质谱仪（AB SCIEX 5500 QQQ-MS）检测 PAGln，使用多反应监测模式（MRM）采集数据，利用 MultiQuant 软件进行积分，利用标准曲线进行 PAGln 含量计算。

1.3 16S rRNA 测序 收集 CHF 组和 Control 组患者入院后 24 h 内清晨新鲜粪便 5.0 g 于无菌管中，将采样管装入自封袋，随后在 2 h 内送至实验室，存放于 -80 ℃超低温冰箱。随后将收集的样本送至广东美格基因科技有限公司进行测序。按照 DNA 提取试剂盒（DP712）说明书进行微生物群落 DNA 抽提，使用 Illumina Nova 6000 高通量测序平台对 DNA 样品进行测序。使用引物为 338F（5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3′）和 806R（5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′）扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3~V4 区域。PCR 反应在 50 μl 的体积中进行：25 μl 的 2x Premix Taq，1 μl 的正向和反向引物，以及 50 ng 的 DNA。PCR 循环在 BioRadS1000 热循环仪（Bio-Rad Laboratory，加拿大）中完成。温度为 94 ℃，时间为 5 min，然后 94 ℃变性 30 个循环，52 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳而纯化。然后利用 GeneTools Analysis Software（Version 4.03.05.0，SynGene） 对 PCR 产物进行浓度对比，按照等质量原则计算各样品所需体积，将各 PCR 产物进行混合。使用 E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit（Omega，USA）凝胶回收试剂盒回收 PCR 混合产物，TE 缓冲液洗脱回收目标 DNA 片段。按照 NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina®(New England Biolabs，USA）标准流程进行建库操作。测序原始序列则使用 Illumina Nova 6000 平台进行 PE250 测序，利用 fastp（0.14.1）软件对测序数据进行处理。根据 UPARSE 聚类方法将不同处理组序列信息聚类为用于物种分类的 OTUs（Operational Taxonomic Units），OTUs 相似性设置为 97%。与 SILVA（16S）数据库进行比对，获得物种注释信息。并根据物种注释情况进一步分析 α 多样性、β 多样性、物种丰度、典型相关分析（CCA）等。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计数资料以相对数表示，两组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher's 确切概率法；呈正态分布的计量资料以（$\bar{x} \pm s$）表示，两组间比较采用独立样本 t 检验；呈非正态分布的计量资料以 M（P_{25}，P_{75}）表示，两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验；变量间的相关性分析采用 Spearman 秩相关。以 P<0.05 为差异有统计学意义。α 多样性指数主要通过 Chao1 和 Simpson 等指数反映丰富度和均匀性。Chao1 主要是估计群落中包含物种的数目；Simpson 数值范围为 0~1，当群落只有一种物种时，此时 Simpson 值最小为 0，同时也是直观理解的多样性最小。当物种种类无限多（丰富度最高），并且每个物种数目均一致（均匀度最高）时，Simpson 值为 1。主坐标分析法（principal coordinates analysis，PCoA）是表征微生物群落差异的一种方法，通过对样本距离矩阵进行降维，简化数据结构，展现样本在特定距离下的分布情况，分析两组样本间微生物群落组成的相异性。相对丰度是指每个物种在样本中所占比例，可以用于比较不同样本中不同物种的相对丰度。Lefse 分析通过进行分组比较的内部进行亚组比较分析，从而找到组间在丰度上有显著差异的物种。CCA 分析可以解释临床表型数据(包

括本研究中的 PAGln）与菌群结构的关系。

2 结果

2.1 两组患者基线资料比较 两组患者年龄、性别、冠心病、高血压、吸烟史、收缩压、白细胞计数、高密度脂蛋白（HDL）和低密度脂蛋白（LDL）水平以及血管紧张素转换酶抑制剂 / 血管紧张素受体拮抗剂（ACEI/ARB）、β 受体阻滞剂使用比例比较，差异均无统计学意义（P>0.05）。两组患者心房颤动、心率、超敏 C 反应蛋白（hs-CRP）、三酰甘油（TG）、血肌酐、尿素氮、尿酸、利尿剂使用比例比较，差异均有统计学意义（P<0.05），见表 1。

2.2 两组患者超声心动图指标、BNP 及 PAGln 水平比较 CHF 组 LVESD、LVEDD、BNP、PAGln 均高于 Control 组，LVEF 低于 Control 组，差异有统计学意义（P<0.05），见表 2。

2.3 Spearman 秩相关分析 Spearman 秩相关分析结果显示：PAGln 与 BNP（r_s=0.792，P<0.001）、LVESD（r_s=0.566，P<0.001）、LVEDD（r_s=0.473，P<0.001）呈正相关，PAGln 与 LVEF（r_s=-0.604，P<0.001）呈负相关。

2.4 血 BNP 和 PAGln 对 CHF 诊断价值 ROC 分析显示，血 BNP 和 PAGln 水平诊断 CHF 患者的曲线下面积（AUC）分别为 0.995、0.913。其对应的灵敏度和特异度分别为 100.0% 和 96.6% 和 82.6% 和 98.3%。最佳截断值分别为 579.2pg/mL、61.735ng/mL，见图 1。

2.5 两组肠道菌群物种群落分析 通过 Venn 图比较 CHF 组和 Control 组肠道菌群的物种组成情况和相似度，由图 2 可知，在门水平上，两组共有 OTUs 数目为 22 个，CHF 组特有 OTUs 数目为 1 个，Control 组特有 OTUs 数目为 24 个；属水平上，两组共有 OTUs 数目为 284 个，CHF 组特有 OTUs 数目为 17 个，Control 组特有 OTUs 数目为 275 个。CHF 组特有 OTUs 数目少于 Control 组，表明 CHF 组微生物多样性水平低于 Control 组。

2.6 两组肠道菌群多样性及菌种类型分析 如表 3 所示，两组 Chao 1 指数比较，差异有统计学意义（P<0.05）；两组 Simpson 指数比较，差异无统计学意义（P>0.05）。

表 1 两组患者基线资料比较〔M（P_{25}，P_{75}）〕

Table 1 Comparison of baseline data between the two groups of patients

组别	例数	年龄〔M（P_{25}，P_{75}），岁〕	男性〔例（%）〕	冠心病〔例（%）〕	高血压〔例（%）〕	心房颤动〔例（%）〕	吸烟史〔例（%）〕	收缩压〔M（P_{25}，P_{75}），mmHg〕
Control 组	46	78.0（74.8，81.3）	25（54.3）	46（100.0）	26（56.5）	5（10.8）	10（21.7）	135.0（123.8，145.5）
CHF 组	58	77.5（73.0，84.0）	26（44.8）	55 （94.8）	36（62.0）	35（60.3）	14（24.1）	130.5（122.0，141.3）
检验统计量值		-0.518[b]	0.930[a]	—	0.328[a]	26.531[a]	0.083[a]	-0.874[b]
P 值		0.605	0.335	0.253	0.567	<0.001	0.773	0.382

组别	心率〔M（P_{25}，P_{75}），次 /min〕	WBC〔M（P_{25}，P_{75}），×10^9/L〕	hs-CRP〔M（P_{25}，P_{75}），mg/L〕	HDL〔M（P_{25}，P_{75}），mmol/L〕	LDL〔M（P_{25}，P_{75}），mmol/L〕	TG〔M（P_{25}，P_{75}），mmol/L〕
Control 组	76.5（71.5，83.0）	6.2（5.4，7.4）	1.6（0.8， 3.8）	1.1（0.9，1.3）	2.6（2.1，3.0）	1.0（0.8，1.4）
CHF 组	84.5（76.0，96.5）	5.7（4.6，8.6）	5.4（2.3，11.5）	1.1（0.9，1.3）	2.2（1.8，2.8）	0.8（0.6，1.1）
检验统计量值	-2.981[b]	-0.471[b]	-4.049[b]	-0.386[b]	-1.636[b]	-3.345[b]
P 值	0.003	0.637	<0.001	0.699	0.102	0.001

组别	血肌酐〔M（P_{25}，P_{75}），μmol/L〕	尿素氮〔M（P_{25}，P_{75}），mmol/L〕	尿酸〔M（P_{25}，P_{75}），μmol/L〕	ACEI/ARB〔例（%）〕	β 受体阻滞剂〔例（%）〕	利尿剂〔例（%）〕
Control 组	69.5（57.3，80.8）	5.8（4.7，6.8）	299.5（265.5，390.5）	17（36.9）	20（43.4）	5 （10.8）
CHF 组	88.0（71.0，115.3）	7.8（6.4，10.3）	465.5（382.3，604.3）	22（37.9）	30（51.7）	58（100.0）
检验统计量值	-4.285[b]	-4.864[b]	-5.429[b]	0.010[a]	0.699[a]	—
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	0.919	0.403	<0.001

注：[a] 为 χ^2 值，[b] 为 Z 值，—为采用 Fisher's 确切概率法；WBC= 白细胞计数，hs-CRP= 超敏 C 反应蛋白，HDL= 高密度脂蛋白，LDL= 低密度脂蛋白，TG= 三酰甘油，ACEI/ARB= 血管紧张素转换酶抑制剂 / 血管紧张素受体拮抗剂。

表 2 两组超声心动图指标、BNP 及 PAGln 水平比较〔M（P_{25}，P_{75}）〕

Table 2 Comparison of echocardiographic indexes，BNP and PAGln levels between the two groups

组别	例数	LVEF（%）	LVESD（mm）	LVEDD（mm）	BNP（ng/L）	PAGln（ng/mL）
Control 组	46	67.5（62.0，71.0）	29.5（27.0，31.0）	48.0（45.0，50.0）	50.3（18.5，110.7	37.8（14.0，50.5）
CHF 组	58	49.5（40.0，64.0）	38.0（30.8，50.0）	52.0（46.8，60.3）	1 763.0（1 011.5，2 796.9）	128.2（101.6，188.8）
Z 值		-6.102	-4.862	-3.344	-8.646	-7.216
P 值		<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001

注：LVEF= 左心室射血分数，LVESD= 左室收缩末期内径，LVEDD= 左室舒张末期内径，BNP=B 型脑利钠肽。

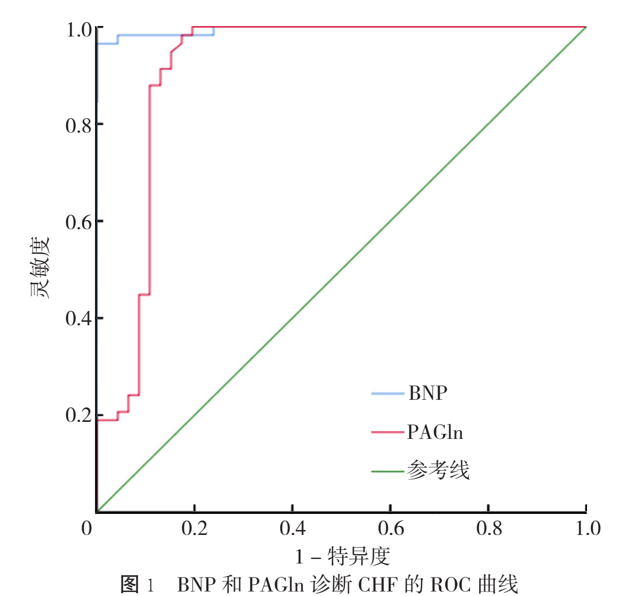
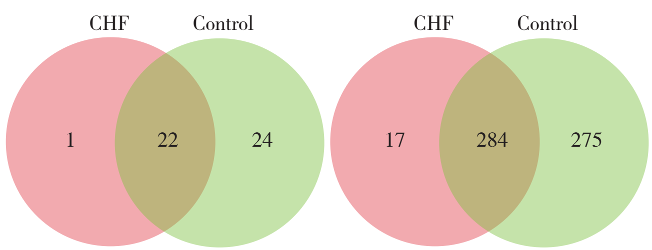


图 1 BNP 和 PAGln 诊断 CHF 的 ROC 曲线
Figure 1 ROC curves of BNP and PAGln for the diagnosis of CHF



注：左为门水平，右为属水平；红色为 CHF 组，绿色为 Control 组。
图 2 两组肠道菌群 Venn 图
Figure 2 Venn diagram of two groups of intestinal flora

如图 3 所示，横纵坐标主成分的贡献率分别为 22.3% 和 11.1%，累计贡献率为 33.4%，能较好的解释原始样本中的信息；两组样本点之间明显分离，说明 Control 组和 CHF 组之间肠道菌群组成存在一定差异。

2.7 两组肠道菌群菌种类型分析 门水平上（图 4），Control 组和 CHF 组最主要的菌种均为出厚壁菌门（Firmicutes），组间比较差异无统计学意义（52.02% 与 49.97%，P>0.05）；拟杆菌门（Bacteroidetes）是两组占比第 2 的菌种，Control 组和 CHF 组分别是 30.38% 和 32.48%，组间比较差异无统计学意义（P>0.05）。而变形菌门（Proteobacteria）及放线菌门（Acti-nobacteria）等其余菌种占比相对较低。属水平上，CHF 组埃希氏－志贺菌属（Escherichia-Shigella）、巨单胞菌属（Megamonas）、克雷伯氏菌属（Klebsiella）、双歧杆菌属（Bifidobacterium）、副拟杆菌（Parabacteroides）、罗姆布茨菌（Romboutsia）相对丰度高于 Control 组（P<0.05），Solimonas 和多尔氏菌属（Dorea）相对丰度低于 Control 组（P<0.05）。

LEfSe 分析（图 5）结果显示，两组共有 12 种肠道

表 3 两组肠道菌群 α 多样性指数比较
Table 3 Comparison of α – diversity index of intestinal flora in both groups

组别	例数	Chao1 指数	Simpson 指数
Control 组	46	1 023.35（879.50，1 289.55）	0.083 9（0.060 4，0.130 0）
CHF 组	58	936.90（780.85，1 120.85）	0.080 9（0.049 8，0.109 0）
P 值		<0.05	>0.05

注：红色为 CHF 组，蓝色为 Control 组。

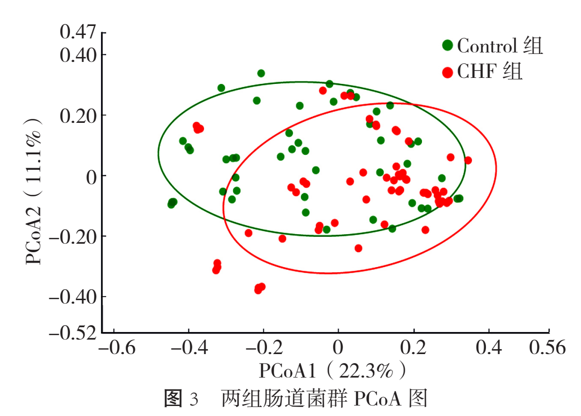
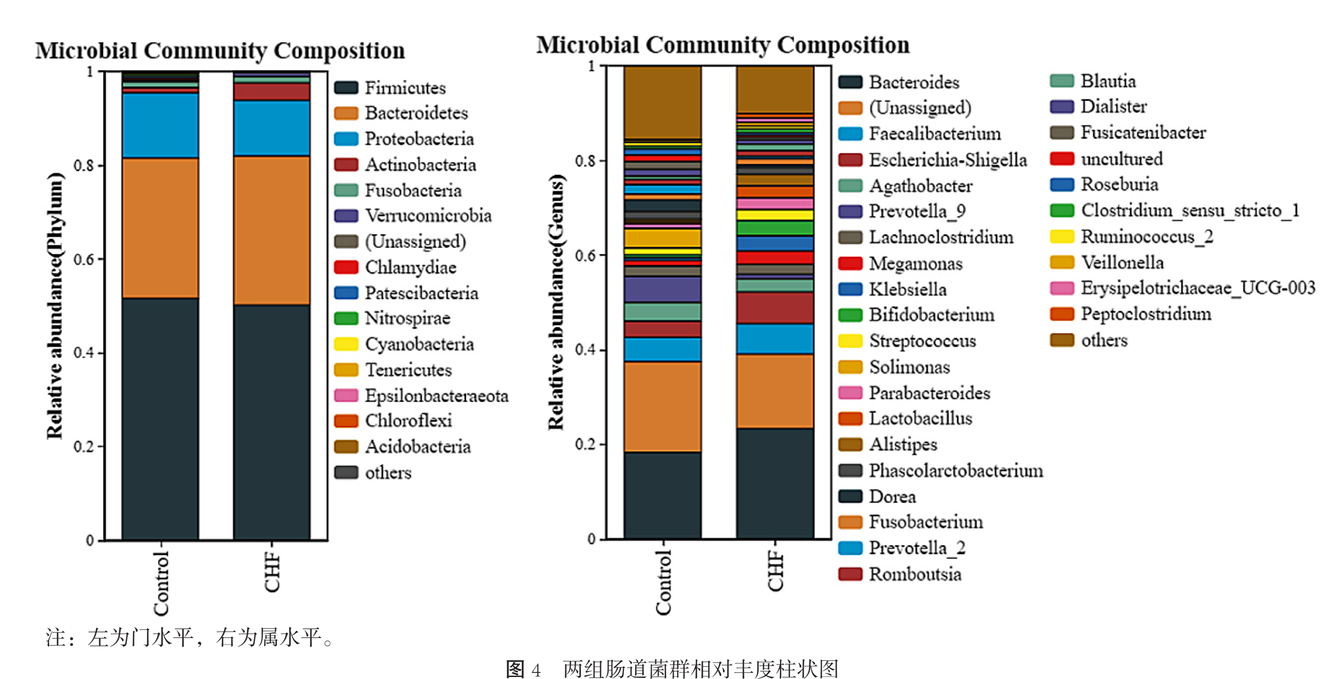


图 3 两组肠道菌群 PCoA 图
Figure 3 PCoA diagram of two groups of intestinal flora

菌群丰度有差异，其中毛螺菌科（Lachnospiraceae）、Solimonadaceae、Solimonas、多尔氏菌属（Dorea）、伯克氏菌科（Burkholderiaceae）在 Control 组中升高（P<0.05），肠杆菌科（Enterobacteriaceae）、埃希氏菌属（Escherichia）、双歧杆菌属（Bifidobacterium）、双歧杆菌科 Bifidobacteriaceae、克雷伯氏菌属（Klebsiella）、乳杆菌科（Lactobacillaceae）、乳杆菌属（Lactobacillus）、巨单胞菌属（Megamonas）、理研菌科（Rikenellaceae）、另枝菌属（Alistipes）、副拟杆菌（Parabacteroides）、盲肠坦纳菌科（Tannerellaceae）在 CHF 组升高（P<0.05）。

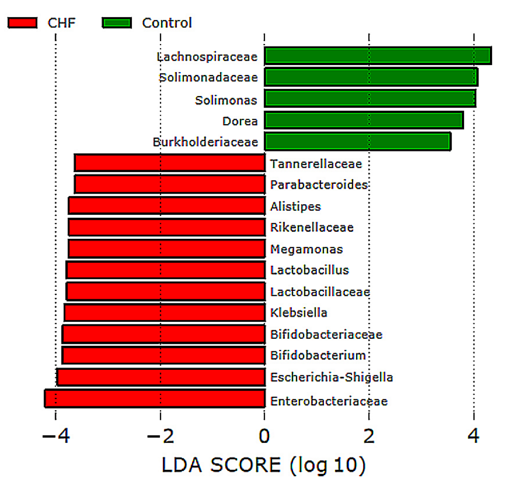
2.8 临床数据和肠道菌群的关联分析 如图 6 所示，黑色箭头表示临床表型数据，其长度表示该指标对肠道菌群的影响程度。图中 CCA1 和 CCA2 对物种分布的总解释量达到了 70.1%，表明在各项数据的约束下，两组粪便样品可以更好地分类，证明心力衰竭对肠道菌群有明显的影响。图 7 表明，BNP、PAGln、LVEDD、LVESD 与 CHF 组菌群相关，其中 BNP 对群落变化影响最大。相关性分析通过计算临床表型数据与物种丰度间的 Spearman 相关系数，得到两两之间的相关性和显著性，选取属水平上丰度前 20 名的物种与临床数据进行相关性分析，如图 7 所示，埃希氏－志贺菌属（Escherichia-Shigella）与 BNP 和 PAGln 呈正相关（P<0.05）；拟杆菌属（Bacteroides）与 BNP 呈负相关（P<0.05）；罗姆布茨菌（Romboutsia）、梭杆菌属（Fusobacterium）、内考拉杆菌属（Phascolarctobacterium）与 BNP 和 PAGln 呈负相关（P<0.05）。



注：左为门水平，右为属水平。

图 4　两组肠道菌群相对丰度柱状图

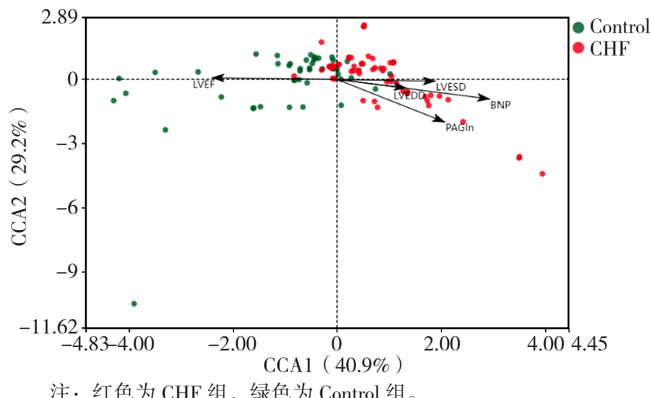
Figure 4　Histogram of relative abundance of intestinal flora in two groups



注：柱状图显示 LDA 值 >3.5 的菌群，即有统计学差异的生物标志物。

图 5　两组肠道菌群 LEfSe 分析柱状图（红色为 CHF 组，绿色为 Control 组）

Figure 5　Histogram of intestinal flora LEfSe analysis of two groups（Red is CHF group，green is control group）



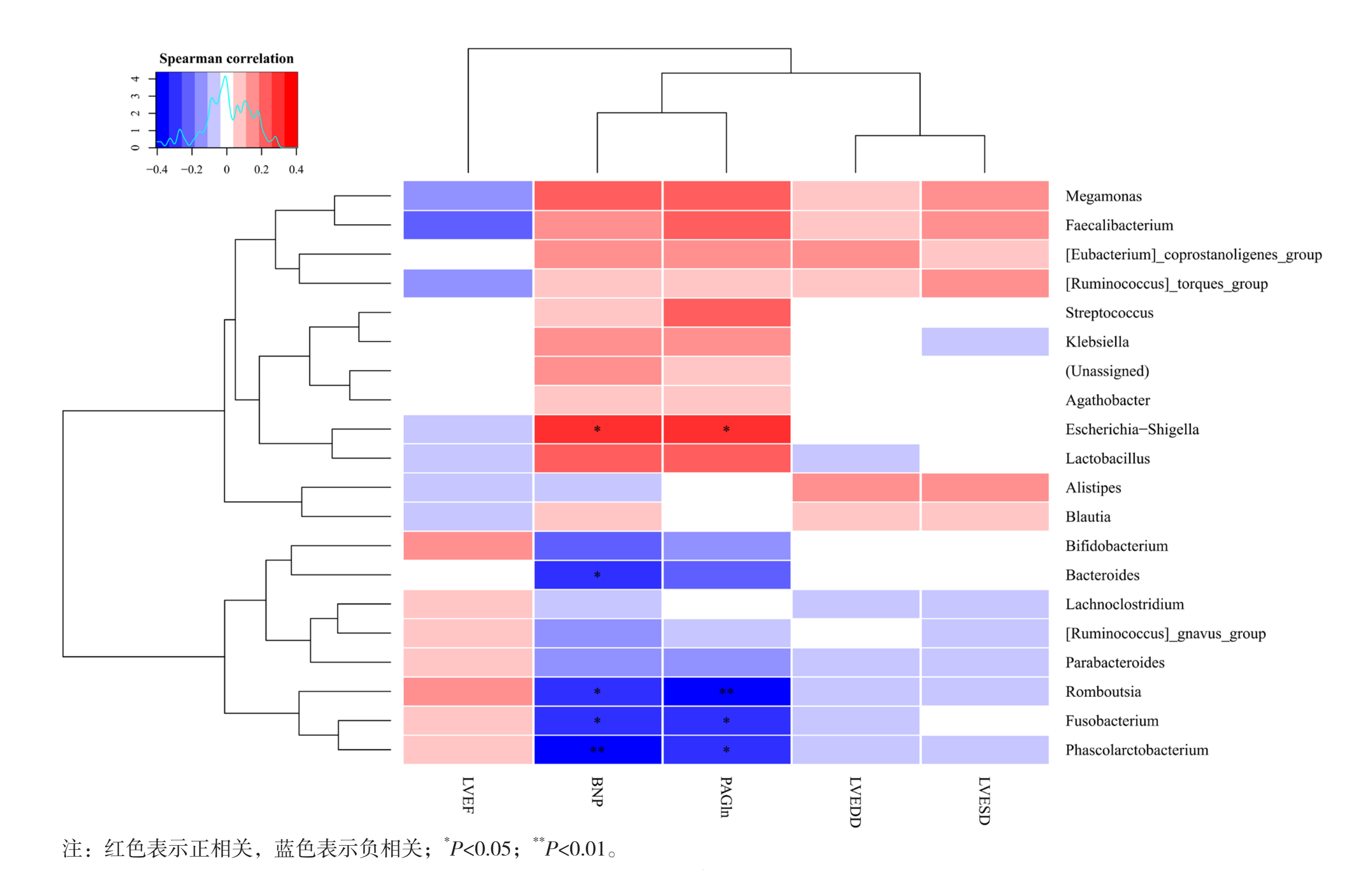
注：红色为 CHF 组，绿色为 Control 组。

图 6　两组临床数据和肠道菌群的 CCA 分析

Figure 6　CCA analysis of clinical data and intestinal flora of the two groups

3　讨论

为了尽量减少混杂因素，本研究招募了年龄、性别和心血管疾病与 CHF 患者相似的患者作为 Control 组。本研究通过 16S rRNA 扩增序列测定发现，尽管两组患者的 CHF 危险因素（冠心病、高血压等）没有显著差异，但两组肠道菌群结构明显不同。组间 OTUs 分布比较发现，门水平上，CHF 组特有 OTUs 数目占比为 2.1%，Control 组为 51.1%，属水平上，CHF 组特有 OTUs 数目占比为 2.9%，Control 组为 47.7%，CHF 组特有 OTUs 数目少于 Control 组，说明心力衰竭引起肠道微生物群物种种类的减少。两组微生物多样性比较发现，α 多样性分析中 CHF 组 Chao 1 指数低于 Control 组（P<0.05），表明两组菌群物种种类有显著差异；两组 Simpson 指数比较无差异，表明两组微生物群物种分布接近。微生物多样性结果说明心力衰竭导致原有的物种多样性下降。β 多样性分析发现两组样本点之间明显分离，并在一定范围内聚集，表明 Control 组和 CHF 组之间肠道菌群组成存在差异，说明心力衰竭改变了正常的肠道菌群组成和分布。研究证明，CHF 患者肠道灌注不足，肠道结构功能发生改变，肠黏膜中细菌浓度显著升高，这可能与疾病导致肠缺氧、肠道局部 pH 改变有关；同时由于心输出量减少所导致的肠道低灌注可进一步破坏肠黏膜的屏障功能，使得细菌移位从而引发全身炎症反应，导致肠道菌群的多样性显著降低，加速心力衰竭进展



注：红色表示正相关，蓝色表示负相关；$^{*}P<0.05$；$^{**}P<0.01$。

图 7　肠道菌群与临床数据相关性分析

Figure 7　Correlation analysis of intestinal flora and clinical data

[9]。两组肠道菌群相对丰度占比显示，在门水平上，CHF 组厚壁菌门（Firmicutes）丰度低于 Control 组，拟杆菌门（Bacteroidota）丰度高于 Control 组。有研究发现，CHF 患者 Bacteroidota 丰度增高，Firmicutes 丰度降低，并且 Firmicutes 丰度和肠道微生物多样性与膳食纤维的摄入量呈正相关[10]。而慢性心力衰竭患者由于长期胃肠道淤血，普遍存在食欲不振等消化道症状，导致膳食纤维摄入不足，引起 Firmicutes 丰度下降。在属水平上，Control 组 Solimonas、多尔氏菌属（Dorea）的相对丰度均高于 CHF 组。CHF 组埃希氏－志贺菌属（Escherichia-Shigella）、巨单胞菌属（Megamonas）、克雷伯氏菌属（Klebsiella）、双歧杆菌属（Bifidobacterium）和副拟杆菌（Parabacteroides）的相对丰度均高于 Control 组。LEfSe 分析结果则显示，在属水平上，Solimonas、多尔氏菌属（Dorea）在 Control 组中明显增高，埃希氏－志贺菌属（Escherichia-Shigella）、双歧杆菌属（Bifidobacterium）、克雷伯氏菌属（Klebsiella）、乳杆菌属（Lactobacillus）、巨单胞菌属（Megamonas）、另枝菌属（Alistipes）、副拟杆菌（Parabacteroides）在 CHF 组中明显增高。两种检验分析中均有统计学差异的菌属为 Solimonas、多尔氏菌属（Dorea）、埃希氏－志贺菌属（Escherichia-Shigella）、巨单胞菌属（Megamonas）、克雷伯氏菌属（Klebsiella）、双歧杆菌属（Bifidobacterium）和副拟杆菌属（Parabacteroides），这些种菌属可能更加具有生物标志物意义。动物模型实验发现自发性高血压性心力衰竭大鼠中 Parabacteroides 显著增加[11]。心力衰竭时肠动力不足、黏膜绒毛吸收障碍、肠上皮黏膜屏障受损，导致肠道通透性增加，肠腔内细菌、食物残渣等不能及时清除，促进 Klebsiella、Escherichia-Shigella 等革兰氏阴性细菌增殖，致使脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）等有毒介质易于进入体内循环，引起炎症反应，进一步加重心力衰竭病情[12]。PASINI 等[13]研究显示 CHF 患者肠道致病菌如 Shigella 数量增加，并且推测血流动力学不稳定时可能导致 Klebsiella 过度生长。Klebsiella 能调控三甲胺（trimethylamine，TMA）合成途径，TMA 可被肠道微生物代谢生成氧化三甲胺（trimethylamine N-oxide，TMAO）[14]。研究发现 CHF 患者血浆 TMAO 水平升高预示更高的死亡风险，喂养 TMAO 的 C57BL6/J 雄性小鼠可出现心力衰竭、利钠肽水平升高及心室重塑[15]。因此，TMAO 可能是肠道菌群参与心力衰竭发生、发展的另一个重要途径。Bifidobacterium 作为有益菌能发挥多种生理作用，包括降低不利细菌（如大肠杆菌）数量，抑制促炎细胞因子产生，调节宿主机体免疫，降低粪便

氨浓度和肠道 pH 值来改善肠道环境。有报道显示心力衰竭患者 Bifidobacterium 丰度和血浆吲哚酚酸盐（indoxyl sulfate，IS）呈负相关，而 IS 水平与左室收缩功能受损密切相关[16]。据此推测，CHF 患者 Bifidobacterium 丰度增高，可能起到一定对抗 IS 的作用。综上表明肠道菌群结构组成改变，可能导致有毒介质和微生物相关代谢产物水平增高，从而加重 CHF 进展。

PAGln 是必需氨基酸苯丙氨酸（phenylalanine，Phe）被肠道微生物分解代谢后生成的副产物，苯丙氨酸被肠道菌群分解代谢后形成苯丙酮酸和苯乙酸[17]，肝酶能催化苯乙酸（PAA）与谷氨酰胺（Gln）生成 PAGln。本研究发现：Spearman 相关性分析结果显示，PAGln 与 BNP 呈正相关，与 LVEF 呈负相关。ROC 分析显示，血 BNP 和 PAGln 对应的灵敏度和特异度分别为 100.0% 和 96.6%、82.6% 和 98.3%。LVEF、LVEDD、LVESD 则是临床上常见的超声心动图指标，能够有效反映左心室结构变化和射血功能。BNP 则是目前心力衰竭诊疗中广泛应用的生物活性激素，是诊断疾病的重要指标。CCA 分析则表明，5 个具有显著差异的临床表型数据对物种分布的解释量为 70.1%，其中 BNP 和 PAGln 对 CHF 组菌群影响最大，并且两者对 CHF 组菌群影响接近；BNP 和 PAGln 箭头之间夹角呈锐角，表明两者之间呈正相关。NEMET 等[7]发现 MACE 患者和糖尿病患者血浆 PAGln 浓度较高，OTTOSSON 等[8]发现 PAGln 血浆浓度可独立预测 MACE 的发生风险。还有报道认为 PAGln 可以作用于心脏中 β2- 肾上腺素能受体，引起交感神经系统过度兴奋，这种持续、过度的交感神经系统激活对心脏、肾脏及血管功能均产生不利影响[18]。以上结果提示 PAGln 水平与心脏功能密切相关，并且和心力衰竭的指标具有良好的相关性，可能作为心脏收缩和舒张功能的潜在筛查指标。

本研究发现，CHF 组患者血浆 PAGln 浓度高于 Control 组。相关性分析表明，埃希氏 - 志贺菌属（Escherichia-Shigella）与 BNP 和 PAGln 呈正相关，据报道，肝脏中苯丙氨酸与谷氨酰胺结合可合成苯乙酰基甘氨酸（phenylacetylglycine，PAGly，小鼠代谢物）或 PAGln（人代谢物），肠道微生物 fldH 基因簇与 porA 基因竞争，将 PAGly 和 PAGln 代谢为苯乙酸[7]。因此，提示 PAGln 可能由 Escherichia-Shigella 代谢产生。Escherichia-Shigella 是一种属于变形菌门的革兰氏阴性菌，研究表明 CHF 患者 Escherichia-Shigella 丰度增高[16]。而在小鼠模型中发现，Escherichia-Shigella 丰度与心肌酶水平、促炎因子、心脏损伤指标呈正相关，与心脏功能和线粒体能量标志物呈负相关[19]。推测 Escherichia-Shigella 丰度增高引起过度炎症会加重心力衰竭进展。此外，相关性分析表明拟杆菌属（Bacteroides）与 BNP 呈负相关；罗姆布茨菌（Romboutsia）、梭杆菌属（Fusobacterium）、内考拉杆菌属（Phascolarctobacterium）与 BNP 和 PAGln 呈负相关。Fusobacterium 是一类能产丁酸的细菌，丁酸能促进肠道合成粘蛋白，保护肠黏膜的完整性[20]。有研究发现 Romboutsia 与收缩压呈负相关，能促进丁酸盐合成[21]。Bacteroides 是产生短链脂肪酸（short-chainfatty acids，SCFAs）的细菌之一，能抑制肠内皮质酮合成从而发挥降压作用[22]。丁酸盐在小鼠模型中可以抑制高血压诱导的心脏炎性反应、心肌肥大和纤维化[20]。Phascolarctobacterium 与 IL-6 水平呈负相关，能减轻异丙肾上腺素诱导的小鼠心脏纤维化[23]。炎症、心肌肥大和心肌纤维化是心力衰竭的基本病理机制，心力衰竭时肠壁通透性增高，致病菌及内毒素更易释放入血，进一步刺激炎症和免疫反应激活。PAGln 则可通过调节肾上腺素能受体信号传导，导致交感神经系统过度激活，加剧心力衰竭进展，同时其已被证明与产生 SCFAs 的肠道菌群（如毛螺菌科和双歧杆菌科等）呈负相关[24]。SCFAs 是膳食纤维通过盲肠和近端结肠中的厌氧细菌发酵而来。研究表明，去氧皮质酮处理后的小鼠模型左心室壁肥厚均能通过高纤维饮食和醋酸纤维饮食而明显降低[25]。还有研究发现，SCFAs 能通过 G 蛋白偶联受体通道介导，从而对 Akt2 基因敲除小鼠所引起的心肌细胞收缩功能障碍起到有益作用；还可通过抑制组蛋白去乙酰化酶（histone deacetylase，HDAC），从而增加 T 细胞调节细胞的功能，达到抗炎作用[26-27]。由此认为，Bacteroides、Romboutsia、Fusobacterium、Phascolarctobacterium 均可产生 SCFAs 并通过作用于 G 蛋白偶联受体发挥抑制炎症过度反应和心肌纤维化。

综上所述，SCFAs 患者中存在肠道菌群紊乱，物种多样性降低，存在特异性差异菌属，这些结果表明心力衰竭时肠道菌群正常功能受损会加重疾病发展。另外，肠道菌群代谢产物 PAGln 水平的高低可能反映心力衰竭的严重程度，可以作为早期筛查、诊断及治疗指标。此外，菌群移植治疗已在肠易激综合征、肥胖、糖尿病以及阿尔茨海默病等患者中使用，随着该治疗技术的成熟，未来可能成为心力衰竭治疗的新方向。

作者贡献：张振东进行资料收集整理并撰写论文；张振东、蔡斌整理数据；蔡斌、王宏伟进行统计学处理；乔增勇进行论文的修订、质量控制及审校。

本文无利益冲突。

参考文献

[1] 中华医学会心血管病学分会心力衰竭学组，中国医师协会心力衰竭专业委员会，中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018[J]. 中华心血管病杂志，2018，46(10)：760-789. DOI：10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2018.10.004.

[2] HAO G, WANG X, CHEN Z, et al. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in China: the China Hypertension Survey, 2012-2015 [J]. Eur J Heart Fail, 2019, 21 (11): 1329-1337. DOI: 10.1002/ejhf.1629.

[3] MARCINKIEWICZ-SIEMION M, CIBOROWSKI M, KRETOWSKI A, et al. Metabolomics - A wide-open door to personalized treatment in chronic heart failure? [J]. Int J Cardiol, 2016, 219: 156-163. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.06.022.

[4] CHEN X, LI H Y, HU X M, et al. Current understanding of gut microbiota alterations and related therapeutic intervention strategies in heart failure [J]. Chin Med J (Engl), 2019, 132 (15): 1843-1855. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000330.

[5] JIN L, SHI X M, YANG J, et al. Gut microbes in cardiovascular diseases and their potential therapeutic applications [J]. Protein Cell, 2021, 12 (5): 346-359. DOI: 10.1007/s13238-020-00785-9.

[6] 许天昱，张宇辉，张健. 肠道菌群与心力衰竭的研究进展 [J]. 中华心血管病杂志，2018，46 (6)：495-498. DOI：10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2018.06.016.

[7] NEMET I, SAHA P P, GUPTA N, et al. A cardiovascular disease-linked gut microbial metabolite acts via adrenergic receptors [J]. Cell, 2020, 180(5): 862-877.e22. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.016.

[8] OTTOSSON F, BRUNKWALL L, SMITH E, et al. The gut microbiota-related metabolite phenylacetylglutamine associates with increased risk of incident coronary artery disease [J]. J Hypertens, 2020, 38 (12): 2427-2434. DOI: 10.1097/HJH.0000000000002569.

[9] LUEDDE M, WINKLER T, HEINSEN F A, et al. Heart failure is associated with depletion of core intestinal microbiota [J]. ESC Heart Fail, 2017, 4 (3): 282-290. DOI: 10.1002/ehf2.12155.

[10] MAYERHOFER C C K, KUMMEN M, HOLM K, et al. Low fibre intake is associated with gut microbiota alterations in chronic heart failure [J]. ESC Heart Fail, 2020, 7 (2): 456-466. DOI: 10.1002/ehf2.12596.

[11] GUTIÉRREZ-CALABRÉS E, ORTEGA-HERNÁNDEZ A, MODREGO J, et al. Gut microbiota profile identifies transition from compensated cardiac hypertrophy to heart failure in hypertensive rats [J]. Hypertension, 2020, 76 (5): 1545-1554. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15123.

[12] WANG Z H, CAI Z L, FERRARI M W, et al. The correlation between gut microbiota and serum metabolomic in elderly patients with chronic heart failure [J]. Mediators Inflamm, 2021, 2021: 5587428. DOI: 10.1155/2021/5587428.

[13] PASINI E, AQUILANI R, TESTA C, et al. Pathogenic gut flora in patients with chronic heart failure [J]. JACC Heart Fail, 2016, 4 (3): 220-227. DOI: 10.1016/j.jchf.2015.10.009.

[14] RATH S, RUD T, KARCH A, et al. Pathogenic functions of host microbiota [J]. Microbiome, 2018, 6 (1): 1-13. DOI: 10.1186/s40168-018-0542-0.

[15] 乐世俊，王文晓，陶慧娟，等. 肠道菌群-TMA-TMAO代谢途径与心血管疾病的研究进展 [J]. 中华心血管病杂志，2020，48(2): 159-163. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2020.02.014.

[16] HAYASHI T, YAMASHITA T, WATANABE H, et al. Gut microbiome and plasma microbiome-related metabolites in patients with decompensated and compensated heart failure [J]. Circ J, 2018, 83 (1): 182-192. DOI: 10.1253/circj.CJ-18-0468.

[17] DODD D, SPITZER M H, VAN TREUREN W, et al. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites [J]. Nature, 2017, 551 (7682): 648-652. DOI: 10.1038/nature24661.

[18] WOO A Y H, XIAO R P. β-Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside [J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33 (3): 335-341. DOI: 10.1038/aps.2011.201.

[19] ZHOU R R, HE D, XIE J, et al. The synergistic effects of polysaccharides and ginsenosides from American ginseng (Panax quinquefolius L.) ameliorating cyclophosphamide-induced intestinal immune disorders and gut barrier dysfunctions based on microbiome-metabolomics analysis [J]. Front Immunol, 2021, 12: 665901. DOI: 10.3389/fimmu.2021.665901.

[20] PATEL B M. Sodium butyrate controls cardiac hypertrophy in experimental models of rats[J]. Cardiovasc Toxicol, 2018, 18(1): 1-8. DOI: 10.1007/s12012-017-9406-2.

[21] QIN R B, WANG J, CHAO C, et al. RS5 produced more butyric acid through regulating the microbial community of human gut microbiota [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69 (10): 3209-3218. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c08187.

[22] YAN X F, JIN J J, SU X H, et al. Intestinal flora modulates blood pressure by regulating the synthesis of intestinal-derived corticosterone in high salt-induced hypertension [J]. Circ Res, 2020, 126 (7): 839-853. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.316394.

[23] SHI L P, DU X Q, ZUO B, et al. Qige Huxin formula attenuates isoprenaline-induced cardiac fibrosis in mice via modulating gut microbiota and protecting intestinal integrity [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 2894659. DOI: 10.1155/2022/2894659.

[24] AWOYEMI A, HOV J R, TRØSEID M. Phenylacetylglutamine from the gut microbiota: a future therapeutic target in heart failure? [J]. Circ Heart Fail, 2023, 16 (1). DOI: 10.1161/circheartfailure.122.010222.

[25] MARQUES F Z, NELSON E, CHU P Y, et al. High-fiber diet and acetate supplementation change the gut microbiota and prevent the development of hypertension and heart failure in hypertensive mice [J]. Circulation, 2017, 135 (10): 964-977. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024545.

[26] LI L L, HUA Y N, REN J. Short-chain fatty acid propionate alleviates Akt2 knockout-induced myocardial contractile dysfunction [J]. Exp Diabetes Res, 2012, 2012: 1-10. DOI: 10.1155/2012/851717.

[27] CHEN X F, CHEN X Q, TANG X Q. Short-chain fatty acid, acylation and cardiovascular diseases[J]. Clin Sci, 2020, 134(6): 657-676. DOI: 10.1042/cs20200128.

（收稿日期：2022-08-17；修回日期：2023-04-12）
（本文编辑：贾萌萌）